مجله دنیای میکروب ها
سال چهارم، شماره اول و دوم (پیاپی ۱۰)، تابستان ۱۳۹۰
صفحات ۲۲ ـ ۱۵

Original Article

مقایسه عملکرد سلول‌های آزاد و تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس در تولید پروتئاز قلیایی

محمد مشهدی کریم[۱]، مهرداد آذین*[۲]، سید لطیف موسوی گرگری[۳]، میثم سرشار[۴]

[۱]کارشناس ارشد، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، [۲]دانشیار، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، [۳]استاد، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی، [۴]کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

چکیده

سابقه و هدف: پروتئازها گروه مهمی از آنزیم‌های صنعتی هستند که امروزه به طور گسترده‌ای در صنایع مختلف مانند صنایع شوینده، چرم، دارویی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مطالعه با هدف تثبیت سلول‌های باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه‌های آلژینات کلسیم، بررسی اثر آن بر میزان تولید پروتئاز قلیایی و تأثیر عوامل مختلف بر پایداری گویچه‌های انجام شد.

مواد و روش‌ها: در ابتدا سلول‌های زنده باسیلوس لیکنی فورمیس در داخل گویچه‌های آلژینات کلسیم تثبیت شدند. بیوکاتالیست‌های تثبیت شده به منظور تولید پروتئاز قلیایی مورد استفاده قرار گرفتند. میزان تولید پروتئاز قلیایی در دو حالت تخمیر توسط سلول‌های تثبیت شده و غوطه‌ور با یکدیگر مقایسه شدند. تاثیر میزان پرشدگی سلولی در گویچه‌ها بر میزان تولید آنزیم مورد مطالعه قرار گرفت. pH و دمای اپتیمم فعالیت آنزیمی نیز تعیین گردید. علاوه بر این تأثیر عواملی مانندpH، زمان عمل‌آوری بیدها و تیمار با گلوتارآلدئید بر پایداری گویچه‌ها نیز بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه میزان تولید و بهر وری پروتئاز قلیایی در سلول‌های تثبیت شده نسبت به حالت آزاد به ترتیب ۷۴ و ۵۴ درصد افزایش نشان داد. در مورد میزان پرشدگی گویچه‌ها نیز بهترین تولید در میزان پرشدگی ۵ درصد به دست آمد. pH و دمای اپتیمم فعالیت آنزیمی به ترتیب ۸ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. بیشترین پایداری گویچه‌ها توسط عمل آوری در pH ۷/۴ و زمان ماند یک ساعت در کلرور کلسیم مشاهده شد. تیمار گویچه‌ها با گلوتارآلدئید نه تنها تأثیری بر افزایش پایداری شان نداشت بلکه کاهش پایداری را به دنبال داشت.

نتیجه‌گیری: استفاده از سلول‌های تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس در بیدهای آلژینات کلسیم می‌تواند موجب افزایش بهره‌وری تولید پروتئاز قلیایی نسبت به روش سلول‌های آزاد شود. از طرفی عدم نیاز به تهیه مکرر مایه تلقیح برای شروع هر تخمیر بسته می‌تواند منجر به کاهش هزینه‌های تولید آنزیم نیز گردد.

واژگان کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، پروتئاز قلیایی، تثبیت سلول، آلژینات کلسیم

دریافت مقاله: دی ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۹۰

*) آدرس برای مکاتبه: : سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.
تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۶۳۶.
پست الکترونیک: azin@irost.org

مقدمه

پروتئازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند. این آنزیم‌ها از اجزای ضروری تشکیل‌دهنده همه اشکال حیات بر روی زمین شامل پروکاریوت‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات می‌باشند. از این میان میکروارگانیسم‌ها به دلیل رشد سریع، نیاز به فضای محدود برای کشت و قابلیت دستکاری ژنتیکی آسان به منظور تولید آنزیم‌های جدید با خواص متفاوت، منابع ترجیحی تولید پروتئازها هستند (۳-۱). پروتئازهای قلیایی میکروبی قسمت اعظم بازار جهانی آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. برای نمونه دو سوم سهم آنزیم‌ها در صنایع شوینده مربوط به پروتئازهای قلیایی می‌باشد. این آنزیم‌ها به دلیل تنوع بیوشیمیایی و کاربردهای گسترده در صنایع دباغی، غذایی، پزشکی، شوینده و فرآیندهایی از قبیل تیمار فاضلاب، بازیافت نقره، تولید پروتئین هیدرولیز شده، بیوسنتز، تجزیه زیستی و بیوترانسفورمیشن اهمیت دارند (۶-۳). پروتئازهای قلیایی به وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، کپک‌ها، مخمرها و همچنین بافت‌های پستانداران تولید می‌شوند (۷). اما با این وجود، جستجوی مقالات با قاطعیت نشان می‌دهد که امروزه باکتری‌ها محبوب‌ترین منبع تولید تجاری پروتئازهای قلیایی می‌باشند (۸). مطالعات نشان داده است که از میان تمامی باکتری‌های جداسازی شده برای استفاده در صنایع مختلف، اعضای جنس باسیلوس به ویژه گونه‌های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی فورمیس تولید کننده‌های تجاری بهتر آنزیم پروتئاز هستند (۴). فرآورده‌های میکروبی به طور معمول به وسیله سلول‌های آزاد یا سلول‌های تثبیت شده تولید می‌گردند. استفاده از سلول‌های تثبیت شده به عنوان کاتالیست‌های صنعتی در مقایسه با فرآیندهای تخمیر با سلول‌های آزاد مزیت‌هایی دارد. از آن جمله می‌توان به قابلیت جداسازی توده سلولی از محیط کشت برای استفاده مجدد، تسهیل عملکرد مداوم برای یک دوره طولانی و افزایش بهره‌وری اشاره نمود. فرآیند تثبیت می‌تواند بر روی بسترهای مختلفی مانند کلسیم آلژینات، کاپاکاراگینان، پلی آکریل آمید، آگار و ژلاتین انجام گیرد. از طرفی انتخاب ماتریکس و تکنیک مناسب برای به حداقل رساندن معایب این روش ضروری می‌باشد (۹ و ۱۰). یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تثبیت سلول به دام‌اندازی (Entrapment) سلول‌ها در آلژینات کلسیم است. زیرا این تکنیک ساده و ارزان بوده و آلژینات سدیم نیز یک ماده بیولوژیکی غیرسمی و در دسترس می‌باشد. به همین دلیل می‌تواند به عنوان یک ماتریکس مناسب برای تثبیت بیومولکول‌ها و میکروارگانیسم‌ها استفاده گردد (۱۱). این مطالعه با هدف تثبیت سلول‌های باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه‌های کلسیم آلژینات، بررسی اثر آن بر میزان تولید پروتئاز قلیایی و همچنین تاثیر عوامل مختلف بر پایداری آن‌ها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه سویه استاندارد: سویه تولید کننده پروتئاز قلیایی باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC1525 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. باکتری بر روی محیط شیب‌دار Brain Heart Infusion Agar با pH ۷/۴ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر ماه یک بار تجدید کشت گردید.

ب) تهیه مایه تلقیح: به این منظور ابتدا یک لوپ کامل از سویه انتخاب شده به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت قلب و مغز گوساله (Brain Heart infusion Broth) استریل با pH ۷/۴ تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر- انکوباتور با دور ۱۵۰rpm گرماگذاری گردید. سپس حجم مشخصی از محیط کشت تلقیح (بسته به میزان پرشدگی (Stuffing rate)) به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. به کمک سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی از سلول‌های رسوب یافته ایجاد و به عنوان مایه تلقیح برای تثبیت مورد استفاده قرار گرفت. تلقیح محیط‌های کشت تولیدی توسط سلول‌های آزاد به طور مستقیم از محیط کشت تلقیح شده ۱۶ ساعته صورت گرفت (۱۱).

ج) تثبیت سلول‌ها درگویچه‌های آلژینات کلسیم: سلول‌های باسیلوس لیکنی فورمیس *PTCC1525* با کمی تغییر در روش پیشنهاد شده آناپورنا (Annapurna) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در گویچه‌های آلژینات کلسیم تثبیت شدند (۱۲). به طور خلاصه، محلول سدیم آلژینات ۳ درصد با حل کردن آلژینات سدیم (با

ویسکوزیته متوسط، شرکت سیگما) در آب جوش تهیه گردید. سپس سوسپانسیون سلولی تهیه شده در مرحله قبل، برای تثبیت در کپسول‌های آلژینات کلسیم به محلول خنک شده آلژینات سدیم اضافه و به خوبی مخلوط گردید. سپس مخلوط به دست آمده به سرنگ استریل ۲۰ میلی‌لیتری انتقال یافته و از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری به داخل بشر حاوی محلول کلرید کلسیم ۰/۳ مولار در حال چرخش ریخته شد. برای تشکیل نهایی گویچه‌ها، هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه پس از چکانده شدن آخرین قطره از مخلوط ادامه یافت. محلول حاوی گویچه‌ها به منظور عمل‌آوری (curing) به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. سپس محلول کلرید کلسیم تخلیه و گویچه‌ها دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. از گویچه‌های تهیه شده به عنوان مایه تلقیح برای محیط کشت تولید استفاده گردید.

د) بررسی اثر pH و زمان عمل‌آوری بر پایداری گویچه‌ها: در ابتدا گویچه‌ها با دو زمان عمل‌آوری ۱ و ۲۴ ساعت تهیه شدند. سپس محیط‌های کشت با pH های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ ساخته و در حجم‌های ۵۰ میلی‌لیتری به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیدند. این محیط‌های کشت با گویچه‌های تهیه شده تلقیح شدند به طوری که برای هر pH، ۳ تکرار با گویچه‌ها با زمان عمل‌آوری یک ساعت و ۳ تکرار با گویچه‌ها با زمان عمل‌آوری ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. ارلن ها به مدت ۲ هفته بر روی شیکر ـ انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm گرماگذاری گردیدند. سپس هر ۲۴ ساعت یک بار وضعیت پایداری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین هر ۴۸ ساعت یک‌بار نیز محیط کشت کهنه با محیط کشت تازه با pH معین تعویض گردید. برای تهیه محیط‌های کشت با pH های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ از بافر Tris-HCl و برای pH ۹ از بافر Carbonate-Bicarbonate استفاده شد.

ه) بررسی اثر غلظت‌های مختلف گلوتارآلدئید بر پایداری گویچه‌ها: پس از تهیه گویچه‌ها و ۱ ساعت عمل‌آوری در کلرید کلسیم، گویچه‌ها دو بار با محلول سالین استریل شستشو و به قسمت‌های مساوی تقسیم شدند. در شرایط استریل هر قسمت به یکی از بشرهای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ درصد از گلوتار آلدئید انتقال یافته (از هر غلظت ۳ تکرار) و به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شدند. گویچه‌ها پس از شستشوی مجدد به درون محیط کشت با pH ۷/۴ انتقال یافتند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm به مدت یک هفته گرماگذاری شدند. در طول این مدت پایداری گویچه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

و) بررسی اثر میزان پرشدگی در میزان تولید آنزیم: برای این منظور گویچه‌ها در ۴ میزان پرشدگی مختلف ۱٪، ۵٪، ۱۵٪ و ۳۰٪ (از هر کدام سه تکرار) ساخته و به محیط تولید انتقال داده شدند. پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm، از نظر میزان تولید آنزیم مورد سنجش قرار گرفتند.

ز) مقایسه تولید و بهره‌وری سلول‌های تثبیت شده و آزاد: در ابتدا سه ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ۷/۴pH به وسیله سلول‌های آزاد و سه ارلن نیز توسط سلول‌های تثبیت شده (با میزان پرشدگی ۵٪) کشت داده شدند. از کشت‌های آزاد و تثبیت شده در زمان‌های مشخص نمونه‌برداری و میزان آنزیم تولید شده آن‌ها تعیین گردید. سپس نقطه زمانی که در آن بالاترین تولید و بهره‌وری ایجاد می‌گردد در هر دو گروه مشخص و با یکدیگر مقایسه شد (۱۰).

ح) تعیین pH بهینه فعالیت آنزیمی: در ابتدا سوبسترای مورد استفاده برای سنجش آنزیمی با pHهای ۷/۴، ۸، ۸/۵، ۹ و ۹/۵ تهیه گردید. برای pH های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ از بافر Tris-HCl و برای pH ۹/۵ از بافر Carbonate-Bicarbonate استفاده شد. سنجش محلول رویی محیط کشت پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm، در هر pH و با ۳ تکرار انجام گرفت (۱۴).

ط) تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی: در ابتدا دمای سوبسترا به دماهای مورد نظر رسانده شد (دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد). سپس محلول رویی به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای مورد نظر در بن ماری گرماگذاری شد. با توجه به اطلاعات به دست آمده، دمای بهینه فعالیت آنزیمی تعیین گردید (۱۴).

ی) سنجش پروتئاز قلیایی: برای این منظور از روش Kunitz استفاده شد (۱۵). به طور خلاصه، پس از پایان زمان انکوباسیون،

جدول ۱: اثر زمان عمل آوری* بر پایداری گویچه ها در دامنه‌های مختلف pH.

pH محیط کشت	زمان عمل آوری در کلرید کلسیم	زمان ماندگاری گویچه‌ها** (شبانه روز)
۷/٤	۱ ساعت	۱۵
	۲٤ ساعت	۱۵
۸	۱ ساعت	۱۲
	۲٤ ساعت	۷
۸/۵	۱ ساعت	۵
	۲٤ ساعت	۱
۹	۱ ساعت	٤
	۲٤ ساعت	۱

*دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۱۵۰ rpm.

**نمونه‌هایی که کمتر از ۵۰ درصد از گویچه‌ها شکسته بود، پایدار در نظر گرفته شد.

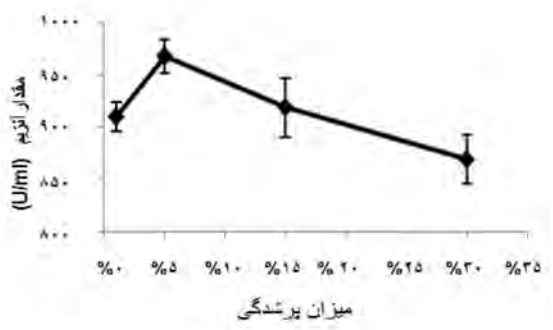
جدول ۲: بررسی اثر گلوتارآلدئید بر پایداری گویچه‌ها.

غلظت گلوتارآلدئید (درصد)	زمان ماندگاری (شبانه روز)
۰/۰۵	۱
۰/۱	۱
۰/۳	۱
۰/۵	۱
۰/۷	۲
۱	۲
شاهد (۰ درصد)	٦

محیط کشت تولید به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت به ۱ میلی‌لیتر از محلول همرستن کازئین (Hammarsten Casein) یک درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری شیکر دار با ۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردید. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به آن خاتمه یافت. برای تهیه شاهد نیز تمام مراحل مشابه با لوله‌های نمونه مورد سنجش بود، با این تفاوت که در ابتدا به محلول رویی TCA اضافه گردید (توقف فعالیت آنزیمی)، سپس بعد از چند دقیقه محلول کازئین ۱ درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد لوله‌های نمونه و شاهد به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردیدند. نقطه جذب محلول رویی لوله‌های تست نسبت به لوله‌های شاهد در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. با تطابق نقطه جذب به دست آمده با نمودار استاندارد تیروزین، میزان تیروزین (اسید آمینه آروماتیک) آزاد موجود در محلول و میزان فعالیت آنزیمی موجود در یک میلی‌لیتر از محلول رویی محیط کشت محاسبه گردید. هر واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که بتواند تحت شرایط آزمایش در مدت یک دقیقه، یک میکروگرم تیروزین را آزاد کند.

نتایج

الف) بررسی اثر *pH* بر پایداری گویچه‌ها: نتایج نشان دادند که با بالا رفتن pH پایداری گویچه‌ها کاهش می‌یابد (جدول ۱). بنابراین گویچه‌ها برای استفاده در دامنه‌های pH قلیایی در مدت زمان بالا مناسب نبودند. همچنین گویچه‌ها با یک ساعت عمل‌آوری نسبت به گویچه‌ها با ۲۴ ساعت عمل‌آوری از پایداری بالاتری برخوردار بودند.



نمودار ۱: اثر میزان پرشدگی بر تولید آنزیم.

نمودار ۲: اثر pH بر میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد.

ب) ارزیابی تیمار گویچه‌ها با گلوتارآلدئید: نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با گلوتارآلدئید در غلظت‌های مورد بررسی نه تنها پایداری را افزایش نداد بلکه موجب کاهش آن نیز شده است (جدول ۲).

ج) ارزیابی اثر میزان پرشدگی بر میزان تولید آنزیم: تأثیر میزان پرشدگی در مقدار تولید آنزیم در چهار نسبت ۱٪، ۵٪، ۱۵٪ و ۳۰٪ بررسی شد. نتایج نشان داد که در حالت ۵٪ تولید آنزیم (۹۶۷ U/ml) نسبت به حالات دیگر در سطح بالاتری قرار دارد (نمودار ۱).

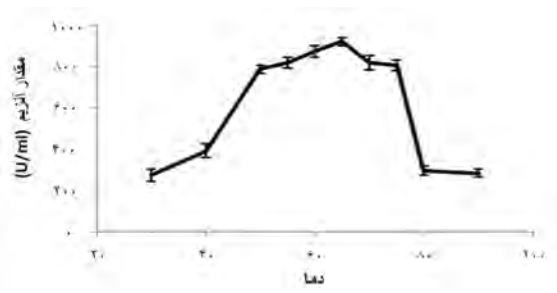
د) *pH* بهینه فعالیت آنزیمی: میزان فعالیت آنزیمی در دامنه‌های pH نشان داد که فعالیت آنزیم در pH ۸ و ۸/۵ تقریباً یکسان و بیشینه است (نمودار ۲). با افزایش pH تا ۹ نیز کاهش بسیار کمی در فعالیت آنزیمی مشاهده شد. اما با افزایش pH به ۹/۵ شیب نزولی فعالیت آنزیمی زیادتر بود.

ه) دمای بهینه فعالیت آنزیمی: نتایج نشان داد که بهترین دامنه دمایی برای فعالیت آنزیم بین ۵۰ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (نمودار ۳). دمای بهینه فعالیت آنزیم ۶۵ درجه سانتی‌گراد محاسبه گردید و آنزیم حتی در ۷۵ درجه سانتی‌گراد نیز حدود ۸۸ درصد فعالیت خود را نسبت به ۶۵ درجه سانتی‌گراد حفظ کرده بود.

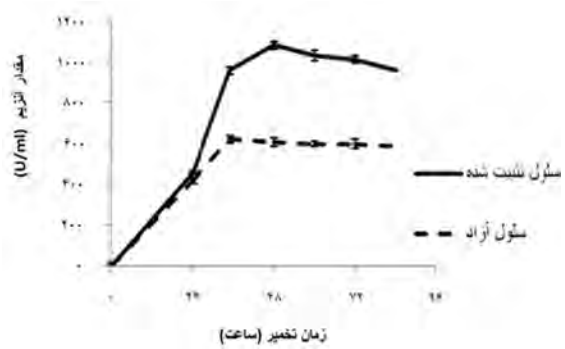
و) مقایسه میزان تولید و بهره وری در سلول‌های تثبیت شده و آزاد: نتایج نشان داد که بالاترین میزان تولید سلول‌های آزاد پس از ۳۵ ساعت، ۶۲۳ واحد آنزیم در میلی‌لیتر و در سلول‌های تثبیت شده پس از ۴۸ ساعت، ۱۰۸۳ واحد در میلی‌لیتر است. این میزان حدود ۷۴ درصد بیشتر از سلول‌های آزاد بود. بنابراین در این مطالعه بالاترین بهره‌وری در هر دو حالت پس از ۳۵ ساعت و برای سلول‌های آزاد و تثبیت شده به ترتیب برابر با ۱۷/۸ و ۲۷/۴ واحد در میلی‌لیتر در ساعت گزارش گردید. در نتیجه بهره‌وری در سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد حدود ۵۴ درصد افزایش نشان می‌دهد. با توجه به این نتایج بهترین زمان برای تعویض محیط کشت تولید مصرف شده با محیط کشت تولید تازه (به منظور استفاده مجدد از گویچه‌ها برای به کارگیری در تکرار تخمیر بسته)، ۳۵ ساعت بود (نمودارهای ۴ و ۵).

بحث

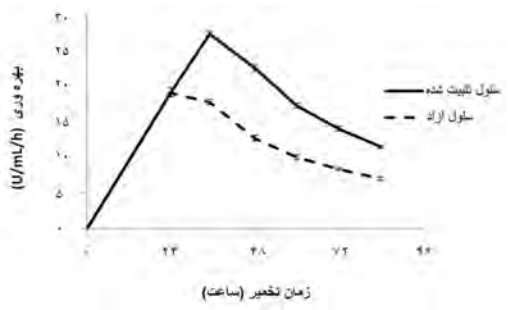
مطالعات مختلف نشان داده است که به طور قابل توجهی میزان محصول و بهره‌وری در مورد تولید پروتئازهای قلیایی با روش تثبیت، بالاتر از حالت سلول‌های آزاد است. از طرفی می‌توان از سلول‌های تثبیت شده برای چندین تخمیر بسته (batch) به عنوان مایه تلقیح استفاده نمود و دیگر به تهیه مایه تلقیح در ابتدای هر مرحله نیاز نمی‌باشد. به عنوان نمونه آدینارایانا (Adinarayana) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از سلول‌های باسیلوس سوبتیلیس PE-11 تثبیت شده در گویچه‌های آلژینات کلسیم و روش تکرار تخمیر بسته، بهره‌وری ۱۵/۱۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر بر ساعت را به دست آورند که این میزان نسبت به روش سلول‌های آزاد ۷۹/۰۳ درصد بیشتر بود. همچنین این محققان گزارش کردند که گویچه‌ها در محیط کشت تولید دارای pH۹ برای ۹ بار تخمیر بسته، در مدت ۲۴ ساعت و بدون تخریب و از هم پاشیدگی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). پتومارتی (Potumarthi) و همکاران در سال ۲۰۰۷ شرایط تثبیت سلول‌های باسیلوس لیکنی فورمیس *NCIM-2042* را در گویچه‌های آلژینات کلسیم



نمودار ۳: اثر دما بر میزان فعالیت آنزیمی در pH ۸/۵.



نمودار ۴: مقایسه میزان تولید پروتئاز توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده.



نمودار۵: مقایسه بهره‌وری توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده.

بهینه‌سازی نمودند. محققین یاد شده نشان دادند که در محیطی با pH ۹/۵، گویچه‌های ایجاد شده برای ۱۲ سیکل ۴۸ ساعته به روش تکرار تخمیر بسته و بدون از هم پاشیدگی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۱). در مطالعه حاضر نیز گویچه‌ها با شرایطی مشابه با تحقیقات یاد شده تهیه شدند. اما بر خلاف نتایج به دست آمده در پژوهش‌های قبلی، در این مطالعه پایداری گویچه‌ها در دامنه‌های pH بالاتر از ۸ به شدت کاهش نشان داد. به طوری که گویچه‌ها در محیط کشت با pH ۹ بیش از ۴ روز دوام نیاوردند. اما در pH ۷/۴، گویچه‌ها تا ۱۵ روز پایداری خوبی داشتند. بنابراین pH محیط کشت تولید برابر با ۷/۴ در نظر گرفته شد. زمان مناسب عمل‌آوری گویچه‌ها نیز یک ساعت محاسبه گردید.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیمار گویچه‌ها با غلظت‌های مختلف محلول گلوتارآلدئید موجب کاهش پایداری آن‌ها می‌شود. در پژوهش جاری تأثیر میزان پرشدگی در بیدها بر میزان تولید پروتئاز قلیایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین تولید در میزان پرشدگی ۵ و ۱۰ درصد به ترتیب برابر با ۹۴۰ و ۹۶۷ واحد در میلی‌لیتر بوده است. میزان پرشدگی نشان‌دهنده مقدار سلول‌هایی است که درون گویچه‌ها جای داده شده‌اند. بنابراین مشخص است زمانی که این نسبت افزایش یابد نشت سلول‌ها و در نتیجه تخریب گویچه‌ها نیز افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، میزان پرشدگی ۵ درصد برای تهیه گویچه‌ها مورد استفاده به منظور تولید آنزیم به روش تثبیت سلولی انتخاب گردید. مقایسه میزان تولید و بهره وری به دست آمده در روش تثبیت شده و آزاد نیز نشان داد که این میزان در حالت اول نسبت به حالت دوم به ترتیب ۷۴ و ۵۴ درصد افزایش داشته است.

از آن‌جایی که پروتئاز قلیایی تولید شده در این پژوهش، از نظر pH و دمای اپتیمم (به ترتیب ۸ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد) بسیار شبیه به پروتئاز تجاری آلکالاز تولید شده توسط شرکت Novozyme می‌باشد، از این رو در صورت تولید انبوه می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای این آنزیم باشد.

نتیجه گیری

استفاده از سلول‌های تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه‌های آلژینات کلسیم دارای مزایایی چون عدم نیاز به تهیه مکرر مایه تلقیح برای شروع هر سیکل، کاهش هزینه‌ها و نیز افزایش بهره‌وری تولید پروتئاز قلیایی نسبت به روش سلول‌های آزاد می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولان و مدیران سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به ویژه پژوهشکده زیست فناوری به دلیل حمایت‌های مالی و تأمین امکانات مورد نیاز این تحقیق کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

1. Deepti A, Pankaj P, Tushar B, Shridhar P. Production of alkaline protease by *Penicillum* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. Process Biochem, 2004; 39(8): 977-981.
2. Wu TY, Mohammad AW, Jahim JMd, Anuar N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. Enzyme Microb Tech, 2006; 39(6): 1223-1229.
3. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biotechnol, 2002; 60(4): 381-395.
4. Jellouli K, Bougatef A, Manni L, Agrebi R, Siala R,Younes I, Nasri M. Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009; 36(7): 939-948.
5. Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, Selvi AT. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus*-CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresour Technol, 2007; 98(14): 2758-2764.
6. Sareen R, Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. Appl Microbiol Biotechnol, 2008; 79(3):399-405.
7. Singh J, Batra N, Sobti RC. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. Process Biochem, 2001; 36(8-9): 781-785.
8. Genckal H. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. A Dissertation Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of MASTER OF SCIENCE, ?zmir Institute of Technology, 2004.
9. Beshay U. Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in calcium alginate beads. Afr J Biotechnol, 2003; 2(3):60-65.
10. Adinarayana K, Jyothi B, Ellaiah P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. AAPS PharmSci Tech, 2005; 6(3): 391-397.
11. Potumarthi R, Subhakar Ch, Pavani A, Jetty A. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. Bioresour Technol, 2007; 99(6): 1776-1786.
12. Jetty A, Gangagni rao A, Sarva rao B, Madhavi G, Ramakrishna SV. Comparative studies of air lift and fluidized bed reactors for streptomycin production by immobilized cells of *Streptomyces bikiniensis* ATCC 11062. Chem Biochem Eng, 2005; 19: 179-184.
13. Yukio Kawaguti H, Ferrari Buzzato M, Castilho Orsi D, Tiemi Suzuki G, Harumi Sato H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of Erwinia sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. Process Biochem, 2006; 41(9): 2035-2040.
14. Shrinvas D, Naik GR. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. Inter Biodeterior Biodegrad, 2011; 65(1):29-35.
15. Kunitz M. Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. J Gen Physiol, 1947; 30(4): 291-310.

Journal of Microbial World
Volume 4, No. 1 & 2, September 2011

Comparison of function of immobilized and free *Bacillus licheniformis* cells in production of alkaline protease

Mohammad Mashhadi-Karim[1], Mehrdad Azin[2], Seyyed Latif Mousavi Gargari[3], Meysam Sarshar[4]

[1]M.Sc., Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.
[3]Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran.
[4]M.Sc., Molecular Biology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Proteases are an important group of industrial enzymes, which are widely used in different industries such as detergent, leather tanning, pharmaceutical, and food industries. The aim of this study was to immobilize *Bacillus licheniformis* cells in calcium alginate beads and study of its effects on the amount of alkaline protease production. Effects of several different conditions on stability of the beads were also examined.

Material and Methods: Bacillus licheniformis cells were immobilized in calcium alginate beads and were used for production of alkaline protease. The amount of enzyme production was compared in immobilized and free-cell fermentation. Effect of stuffing rate (%) on the enzyme production was studied. Optimum pH and temperature of enzyme activity were also determined. Furthermore, effects of pH, curing time and treating the beads by glutaraldehyde on stability of the beads were examined.

Results: In this study the amount of production and productivity of protease in immobilized cells state showed an increase of 74% and 54% in comparison to free cells state, respectively. The highest amount of the production of the enzyme was obtained in stuffing rate of 5% (v/v). Optimum pH and temperature of the enzyme activity were determined 8 and 65 °C, respectively. The highest stability of the beads was observed at curing time of 1 hour at pH of 7.4. Treating the beads by glutaraldehyde was detrimental to their stability.

Conclusion: Use of immobilized cells of *Bacillus licheniformis* in calcium alginate beads on the one hand, can increase productivity of the alkaline protease in comparison to free cells method, and on the other hand, reduces the cost of the enzyme production because of eliminating the need of preparation of inoculum for the new batches.

Keywords: Bacillus licheniformis, Alkaline protease, Cell Immobilization, Calcium Alginate.

Correspondance to: Mehrdad Azin
Tel: +982156276636
E-mail: azin@irost.org
Journal of Microbial World, 2011, 4(1&2): 15-22